

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

10/030226
PCT/JP00/04549

07.07.00 #3

REC'D 25 AUG 2000

WIPO

PCT

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

JP00/4549

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 4月25日

出 願 番 号
Application Number:

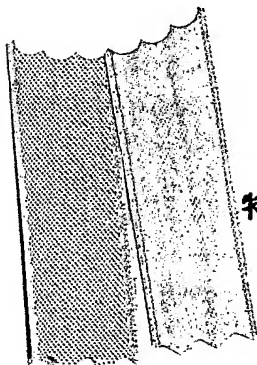
特願2000-128993

出 願 人
Applicant(s):

株式会社ヘリックス研究所

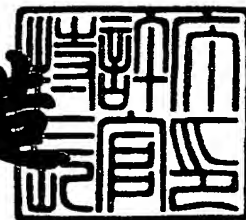
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月11日



特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3062671

【書類名】 特許願

【整理番号】 H1-106DP3

【提出日】 平成12年 4月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市貝渕 3 - 9 - 1 7 - 4 0 8

 【氏名】 森川 記行

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都小金井市東町 5 - 1 9 - 1 5

 【氏名】 増保 安彦

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県藤沢市辻堂新町 1 - 2 - 7 - 1 0 5

 【氏名】 太田 紀夫

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町大室 5 1 1 - 1 2

 【氏名】 磯貝 隆夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都板橋区氷川町 2 7 - 3 - 4 0 3

 【氏名】 西川 哲夫

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 4 5 0 8 - 1 9 O - F L A T S
2 0 1

 【氏名】 河合 弓利

【特許出願人】

 【識別番号】 597059742

 【氏名又は名称】 株式会社ヘリックス研究所

【代理人】

 【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第194179号

【出願日】 平成11年 7月 8日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂肪酸輸送タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 7】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項 8】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 9】 配列番号：5 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【請求項 10】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、および

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する化合物。

【請求項12】 請求項1または2に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 本発明のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、

(b) 長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、

(c) 被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法により単離されうる、請求項1または2に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脂肪酸輸送活性を有するタンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内でオレイン酸等の長鎖脂肪酸は細胞膜の合成、細胞内情報伝達、タンパク質の修飾、転写調節など細胞の営みに必要なエネルギー源として重要な役割を果たしている。まず食餌中の脂質は膵臓リパーゼにより脂肪酸とグリセロールに分解され(Chapus C. Biochimie 70: 1223-1234, 1998)、そのうち脂肪酸は再エステル化されてリンパ系システムに移動する(Green P. H. and Aust. N. Z. J. Med. 11: 84-90, 1981)。遊離脂肪酸はまた一方で脂肪組織においてトリアシルグリセロールの分解により生じる。このようにして生成された遊離脂肪酸は循環系では血清アルブミンと結合した状態で存在して脂肪細胞、肝細胞、心臓平滑筋細胞などに取り込まれ、それら細胞内のミトコンドリアなどで β -酸化されることにより長鎖脂肪酸の最大90%がエネルギー源となる。

【0003】

長鎖脂肪酸が小腸、肝細胞、心筋細胞、脂肪細胞において選択的に取り込まれ

ていることはこれまでによく知られていたが、それらが細胞内に取り込まれる際に膜を輸送する分子メカニズムは議論のあるところであった。そしていくつかのタンパク質が長鎖脂肪酸の輸送に関わる候補として挙げられた (Ockner R. K. and Kane J. P. J. Biol. Chem. 257: 7872-7878, 1982)、そのうちのひとつが、1994年に Lodish らにより単離・クローニングされた Fatty Acid Transport Protein (FATP) である。

FATP はマウス脂肪細胞から expression cloning strategy により単離された 63K Da の plasma membrane protein である。これを持続的に発現させた動物細胞は長鎖脂肪酸の取り込みを選択的に上昇させた (Shaffer J. E. and Lodish H. F. Cell 79: 427-436, 1994)。その後の研究によりこのタンパク質にはいくつかのホモログが存在することが示され、マウスについて FATP-1, 2, 3, 4, 5 がクローニングされた。そのうち完全長のものとして活性が確認されたものは FATP-1, -2, -5 であり、FATP-3, 4 は完全長でないため活性は確認されていない (Hirsch, D. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 8625-8629, 1998)。

【0004】

FATP は長鎖脂肪酸の代謝経路のうち重要なステップの一つである、細胞内への輸送に関わる膜タンパク質である。これまでに長鎖脂肪酸の代謝異常により、心筋症、筋肉症、代謝性疾患、腎障害、神経系機能障害、突然死等の臨床例が報告されている (Kelly, D. P. and Strauss A. W. N. Eng. J. Med. 330: 913-919, 1994; Saudubray J. M. In New Developments in Fatty Acid Oxidation, P. M. Coates and K. Tanaka eds., New York: Wiley-Liss) ことから、この膜タンパク質の機能不全によりこれらの疾患への関与が推測される。

特に糖尿病ではインスリン欠乏により遊離脂肪酸が上昇し、これが病態誘発の一因ともなっている。実際に糖尿病患者の血漿中の遊離脂肪酸濃度は、健常人の食後の約 4 倍、飢餓時の約 3 倍にまで上昇することが知られている。細胞レベルでも FATP の発現がインシュリンや PPAR γ による制御を受けることが報告されている (Martin G. J. Biol. Chem. 272: 28210-28217, 1997)。血漿中の遊離脂肪酸を代謝促進すること、つまり FATP の作用を増強することでこの現象を軽減させることが期待される。

【 0 0 0 5 】

また過剰の脂肪の蓄積が肥満の原因になっていることから、FATPの作用を促進することは脂肪分解を促進することにもなるので、肥満の治療効果も期待される。またその一方でこの膜タンパク質は体の広い範囲に分布し、小腸への分布もみられること、そして食餌中の脂肪酸の取り込みにも直接関わることから例えば小腸におけるFATPの作用を特異的に抑制することで肥満の軽減効果も考えられる。さらに動物の個体レベルで敗血症モデルであるLPS投与モデルラットでFATPが誘導される(Memon R. A. Am. J. Physiol. 274 (2 Pt 1), E210-217, 1998)ことから、FATPの作用を抑制することにより敗血症をはじめとする炎症性疾患の治療も期待できる。

さらに、一般にヒト膜タンパク質には、Tissue plasminogen activator (TPA)のように、そのものが医薬品として有用なものや、膜レセプターのように医薬品の標的タンパク質になりうるものが多い。

このように新規な膜タンパク質、特に脂肪酸の代謝に関与する膜タンパク質を提供することは、非常に大きな意義がある。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脂肪酸輸送活性を有する膜タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

上記のように、膜タンパク質、特に長鎖脂肪酸の細胞への取り込みに関与する膜タンパク質、および該取り込みを制御する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝異常に伴う疾患の治療薬として期待される。

そこで本発明者らは、上記の課題を解決するために、新規なヒト遺伝子のクローニングを目的として、下記の如く鋭意研究を行った。まず、オリゴキャップ法(Maruyama K. and Sugano S. Gene 138: 171-174, 1994; Suzuki Y. et al. Gene 200: 149-156, 1997)で作製した全長率の高いヒトcDNAライブラリーを構成するクローンを単離した。次いで、この方法で取得した全長率の高いcDNAクローン

の塩基配列を5'側と3'側の両側から決定した。そして、ATGpr (Salamov A. A. et al. *Bioinformatics* 14: 384-390, 1998; <http://www.hri.co.jp/atgpr/>)等で全長cDNAクローンであると予想されるヒト全長cDNAを選択した。こうして得られたヒト全長cDNAクローンの塩基配列を利用し、PSORT (Nakai K and Kanehisa M. *Genomics* 14: 897-911, 1992)でシグナル配列を持つと予想されるクローンを特異的に選別し、膜タンパク質をコードするcDNAを有すると予想されるクローンを取得した。該クローンの全長cDNA配列を解析し、その塩基配列がコードするアミノ酸配列を推定した。そして推定アミノ酸配列に基づいて、BLAST (Altschul S. F. et al. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990; Gish W. and States D. J. *Nature Genet.* 3: 266-272, 1993; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)により、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>)やSwissProt (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/swissprot_db/swisshome.html)を利用して相同性解析を行った。

【 0 0 0 8 】

こうした解析を通じて、本発明者らは全長cDNAクローンの1つであるPSEC67に注目した。このクローンは、マウスFatty Acid Transport Protein-3 (FATP-3)と塩基レベルで80%、そしてアミノ酸レベルで83%のホモロジーを有する新規なタンパク質をコードしていた。更に本発明者らは、PSEC67によってコードされるタンパク質が、実際に長鎖脂肪酸を取り込む作用を持つことを実験的に明らかにした。そして、このタンパク質の活性を制御することにより、長鎖脂肪酸の代謝に関与する疾患の予防や治療が可能となることを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、以下の新規な膜タンパク質、およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

【 0 0 0 9 】

〔1〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

〔2〕 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

〔3〕 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕 〔3〕 に記載のDNAを含むベクター。

〔5〕 〔4〕 に記載のベクターを保持する形質転換体。

〔6〕 〔5〕 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質の製造方法。

〔7〕 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質の部分ペプチド。

〔8〕 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質に対する抗体。

〔9〕 配列番号：5 に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA。

〔10〕 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

（a） 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、および

（b） 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

〔11〕 〔10〕 に記載の方法により単離されうる、〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質に結合する化合物。

〔12〕 〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物をスクリーニングする方法であって、

（a） 本発明のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、

（b） 長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、

（c） 被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む方法。

〔13〕 〔12〕 に記載の方法により単離されうる、〔1〕 または〔2〕 に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規な膜タンパク質PSEC67に関する。本発明のタンパク質に含まれるPSEC67（配列番号：2）は、レチノイン酸により分化を誘導したヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞であるNT-2神経前駆細胞から調製されたcDNAをスクリーニングすることにより得られた遺伝子がコードする膜タンパク質である。このタンパク質は、脂肪酸輸送活性を持つ新規な膜タンパク質である。従って、本発明のタンパク質やその遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝に関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。

【 0 0 1 1 】

本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

一方、天然のタンパク質は、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wily and Sons Section 16.1-16.19）。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照）などにより本発明のタンパク質を調製することも可能である。

【 0 0 1 2 】

本発明には、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパ

ク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。「配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等」とは、対象となるタンパク質がPSEC67タンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。PSEC67タンパク質が持つ生物学的特性としては、オレイン酸、またはアラキドン酸等の長鎖脂肪酸の取りこみ活性が挙げられる。すなわち本発明のタンパク質は、細胞膜表面に発現し、オレイン酸、またはアラキドン酸に代表される長鎖脂肪酸を細胞内へ輸送する活性を持つ。本発明のタンパク質により、細胞内へ輸送される長鎖脂肪酸としては、前記オレイン酸、アラキドン酸の他に、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸等の、C=10-26の脂肪酸を例示することができる。本発明においてPSEC67と機能的に同等なタンパク質は、配列番号：2に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも85%以上のアミノ酸の同一性を示すことが望ましい。本発明における機能的に同等なタンパク質は、具体的には90%以上、より望ましくは95%以上のアミノ酸配列の同一性を示す。アミノ酸配列の同一性は、BLAST検索アルゴリズムなどによって決定することができる。

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。

【0013】

PSEC67と機能的に同等なタンパク質は、当業者であれば、例えば、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 8.1-8.5)を利用して調製することができる。また、このようなタンパク質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。

【0014】

細胞膜タンパク質が持つ脂肪酸を細胞内に輸送する活性は、公知の方法によって確認できる。具体的には、活性を確認すべきタンパク質を発現した細胞を、脂肪酸の存在下で培養し、細胞への脂肪酸の取りこみを観察することによりその活

性を確認することができる。脂肪酸の取りこみは、脂肪酸を放射性同位元素(RI)等で標識しておくことによって観察することができる。取りこみを観察するための脂肪酸としては、オレイン酸、またはアラキドン酸等が用いられる。あるいは、これら以外の脂肪酸であっても、PSEC67によって取りこみが確認された脂肪酸であれば、任意の脂肪酸を用いることができる。PSEC67による脂肪酸の取りこみは、被検脂肪酸の存在下でPSEC67の発現細胞を培養し、この細胞による被検脂肪酸の取りこみを観察することにより確認することができる。より具体的には、下記の方法を例示することができる。

- (1) 本発明のタンパク質を発現した細胞をチャコール処理された血清存在下で培養する。
- (2) 放射性同位元素で標識された脂肪酸とBSAとの会合体を作製する。
- (3) その会合体を細胞に添加して取り込まれる脂肪酸を検出する。

【0015】

また、PSEC67と機能的に同等なタンパク質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術、あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.3-6.4) を用いてPSEC67をコードするDNA配列 (配列番号: 1) またはその一部をもとにこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることは、通常行いうることである。このようにPSEC67をコードするDNAとハイブリダイズするDNAにコードされるタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

機能的に同等なタンパク質を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0016】

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらに厳

しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるタンパク質は、通常、PSEC67とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

【0017】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.1-6.4)を用いてPSEC67をコードするDNA配列（配列番号：1）の一部をもとにプライマーを設計し、PSEC67をコードするDNA配列またはその一部と相同性の高いDNA断片を単離して、これをもとにPSEC67タンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも可能である。

【0018】

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、例えば、シグナルペプチドが除去されたタンパク質が含まれる。さらに、抗体調製のための抗原ペプチドが含まれる。部分ペプチドが本発明のタンパク質に特異的であるためには、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、より好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合する受容体のスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造する。

【 0 0 1 9 】

更に、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAとしては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。本発明のDNAは、上記のように、PSEC67をコードするDNA配列（配列番号：1）もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列をもとに合成したプライマーを用いたPCR法等の常法により単離することが可能である。

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば 宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBlue scriptベクター（Stratagene社製）などが好ましい。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466～472, 1988）などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は常法により制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons, Section 11.4～11.11）。

【 0 0 2 1 】

加えて本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。タンパク質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などを例示することができる。

宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987 : Publish. John Wiley and Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。

【 0 0 2 2 】

また、本発明は、配列番号：1に記載のDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。本発明のDNAと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のDNAとハイブリダイズし、他のDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。このようなDNAは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

本発明のDNAは、本発明のタンパク質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、本発明のDNAをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査したり、本発明のDNAをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、ゲノムDNA-PCRやRT-PCRにより本発明のタンパク質をコードするDNAやその発現制御領域を増幅し、RFLP解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明において、「配列番号：1に記載のDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内

の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明のタンパク質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患（特に、長鎖脂肪酸の代謝に関連した疾患）の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：5に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオネート法(Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21, 1988)などにより調製することが可能である。

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行う。

【 0 0 2 4 】

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製したタンパク質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

【 0 0 2 5 】

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の

タンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

【 0 0 2 6 】

また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al. Nat. Genet. 15: 146-156, 1997」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる (Methods in Enzymology 203, 99-121, 1991)。

【 0 0 2 7 】

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

該スクリーニング方法により、選択される化合物は、本発明のタンパク質による細胞への脂肪酸取り込み活性を制御する働きが期待される。

【 0 0 2 8 】

具体的な方法としては、例えば、本発明のタンパク質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ精製する方法、twoハイブリッドシステムを利用する方法、ウエストウエスタンブロッティング法、コンビナトリアルケミストリー技術におけるハイスループットスクリーニングによる方法など多くの公知の方法を利用することができる。

スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

標識としては、 ^{125}I などのRI標識のほか、酵素（アルカリホスファターゼ等）標識も可能である。また、本発明のタンパク質を標識せずに用いて、本発明のタンパク質に対する抗体を標識して用いて検出することも考えられる。

【 0 0 2 9 】

また、本発明の膜タンパク質による長鎖脂肪酸の細胞内への取り込み活性を指標として、該取り込み活性を制御する化合物のスクリーニングを行うことができる。

このスクリーニング方法は、（a）本発明のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、（b）長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、および（c）被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む。

【 0 0 3 0 】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標としたスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

スクリーニングに使用する長鎖脂肪酸としては、オレイン酸、アラキドン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸等を挙げることができる。特に、オレイン酸、またはアラキドン酸を好適に使用することができる。その他、PSEC67による取りこみ活性を確認された脂肪酸は、いずれも本発明によるスクリーニング方法に用いることができる。

上記長鎖脂肪酸の標識としては、上記のRI標識等が挙げられる。上記取り込み活性の測定は、RI標識の場合、細胞中の放射活性をシンチレーションカウンター等で計測することにより行うことができる。計測した値が、被検試料が存在しない場合と比較して有意に高い場合、取り込み活性を促進すると判定する。反対に、計測した値が、被検試料が存在しない場合と比較して有意に低い場合、取り込

み活性を阻害すると判定する。

上記の方法によりスクリーニングされた化合物、特に脂肪酸の取り込みを促進する化合物は、糖尿病、動脈硬化に対する治療効果が期待できる。一方、脂肪酸の取り込みを阻害する化合物は、抗肥満薬として治療効果が期待できる。また、本発明のタンパク質が関連する疾患（例えば、糖尿病、動脈硬化、肥満等代謝性疾患、心筋症、筋肉症、腎障害等）の予防薬または治療薬への応用が考えられる。

【 0 0 3 1 】

本発明のスクリーニング方法により単離された化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせ、製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行う。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【 0 0 3 2 】

【実施例】

【実施例 1】 発現プラスミド「pcDNA 3.1(-) - PSEC67」の構築

PSEC67のコーディング領域をpcDNA3.1(-)に連結した。まずプライマーを次のように設計した。

Primer 1; 5'- GGAATTCCTGCCGATAGAGGAAGCGGGCTCCAT -3' (配列番号: 3)

Primer 2; 5'- CGGGATCCACCTGCAACGGCCCCCAGAGAGTTC -3' (配列番号: 4)

pME18SFL3-PSEC67をテンプレートとし、LA taq polymerase (Takara) を用いてPCR法によりフラグメントを増幅した。このcDNAフラグメントとベクターpcDNA 3.1 (-) (INVITROGEN) をそれぞれBamHI、EcoRIで処理した後、それぞれをアガロースゲル電気泳動により精製し、Takara Ligation kit ver.2を用いて連結した。これをE.coli DH5 alphaに導入して、発現用プラスミドを得た。このプラスミドを用いて塩基配列の確認を行った。

【0033】

〔実施例2〕 発現確認用プラスミド「pcDNA 3.1(-)/MycHis - PSEC67」の構築
PSEC67のcoding regionをpcDNA 3.1(-) / MycHis-Aに連結した。まずプライマーを次のように設計した。

Primer 1; 5'- GGAATTCCTGCCGATAGAGGA AGCGGGCTCCAT -3' (配列番号: 5)

Primer 3; 5'- CGGGATCCGATTCTGAAGGTTTCCTGCCAG -3' (配列番号: 6)

次に、pME18SFL3-PSEC67をテンプレートとし、LA taq polymerase (Takara) を用いてPCR法によりフラグメントを増幅した。このcDNAフラグメントとベクターであるpcDNA3.1 (-) / MycHis-A (INVITROGEN) をそれぞれBamHI、EcoRIで酵素処理した後、それぞれをアガロースゲル電気泳動により精製し、Takara Ligation kit ver.2を用いて連結した。これをE.coli DH5 alphaに導入して、MycHisタグ付きの発現確認用プラスミドを得た。これを用いて塩基配列の確認を行った。

【0034】

〔実施例3〕 発現の確認

(1) プラスミドの導入

発現用プラスミドをリン酸カルシウム法、またはリポフェクタミン等を用いたその他の方法により、COS-7細胞、293細胞等の動物細胞に導入した。

COS-7細胞のリン酸カルシウム法は以下のように行った。

まず1日目に10cm径シャーレに細胞を1,000,000 cells/dishになるよう調製し、培地20 ml中、37℃で20時間培養を続けた。10 μ gの発現プラスミドを、983 μ lの0.1 x TEに溶解し、さらに142 μ lのCaCl₂溶液を加えて混合し、氷中で冷却した。別のチューブに氷冷した1.125mlの2 x HBS を用意し、先に混合したDNA液1.

125 mlを混合した。2.25 mlずつをシャーレに加えよく混合した後、37℃で6時間保温し、グリセロールショックの操作を行った。すなわち、5 mlのTBSで2回洗浄後、5mlのTBS-20% グリセロールで細胞を洗浄した。さらに5mlのTBSで細胞を2回洗浄、5mlのPBS(-)で細胞を1回洗浄後、10mlの培地を加えて37℃で20時間培養した。培地を新しいものに換えた後さらに37℃、5% CO₂で培養した。なお、293細胞については、グリセロールショックの操作を省き、次の日に培地を交換した。導入して3日目に、培養上清と細胞を得た。使用した溶液の組成は以下の通りである。

・ 2 x HBS :

HEPES 5.96g

NaCl 8.18g

0.1M Na₂HPO₄ 7.5 ml/ 500 ml 水 (pH 7.12)

・ TBS (1Lあたり) :

NaCl 8g

KCl 0.38g

Na₂HPO₄/12H₂O 0.2g

Tris-Cl 3g

CaCl₂/2H₂O 0.114g

MgCl₂/6H₂O 0.115g

【 0 0 3 5 】

(2) サンプルの調製

細胞はPBS(-)バッファーで2回洗浄後、遠心 (500 x g) により集めた。これに200 μlのhomogenizing buffer (20 mM Tris-Cl、1mM A-PMSF)を加え、溶融解(freeze-thaw)を3回繰り返した後テフロンホモジナイザーを用いて氷中10往復させて細胞を破碎した。これを1000 x gで遠心して残渣をおとした(除いた)上清画分を細胞画分とした。培養上清画分は培養後の培地をそのまま、または分子量10,000カットのメンブレンフィルター (CENTRICON; AMICON) を用いて濃縮したサンプルを用意した。細胞画分、及び培養上清画分のサンプルをそれぞれ8 μl用いてウエスタンブロット法により発現を確認した。なお、細胞画分8 μlはタ

ンパク質量として約15 μ gに相当する。ウエスタンブロットは以下のように行った。

【 0 0 3 6 】

(3) タンパク質の検出 (ウエスタンブロッティング)

サンプル8 μ l に5 x loading bufferを2 μ l加え、100℃で5分間反応させて変性させた後氷中にて2分間冷却した。これをSDS-PAGE (PAGEL, ATTO Corporation) に付し、20mAで約1時間電気泳動を行った。終了後、ゲルをブロッティングバッファー中で約20分間平衡化させた後、同bufferで約10分間平衡化したPVDFメンブレンにゲル中のタンパク質をTRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO RAD)を用いて電氣的にトランスファーした。

・ブロッティングバッファー (1L中) :

3g Tris-base

14.4g グリシン

20% エタノール

タンパク質をトランスファーしたPVDFメンブレンをブロックエース (大日本製薬) で室温中2時間、または4℃で一晩ブロッキングした後、一次抗体 (anti-myc antibody, INVITROGEN) を1時間反応させた。メンブレンを洗浄後、二次抗体 (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research)を室温で1時間反応させた。さらにメンブレンを洗浄後、ECL Western blotting detection reagents (Pharmacia)を用いてタンパク質を検出した。

その結果、PSEC67を導入した細胞の細胞画分に約70Kdaのタンパク質のバンドが検出された。培養上清画分、及びMock transfection (293細胞にベクターのみを導入したもの) の細胞画分、培養上清画分のサンプルはこのバンドが検出されなかった。従って、細胞画分でのPSEC67タンパク質の発現が確認された (図1)。

【 0 0 3 7 】

〔実施例4〕オレイン酸の取り込み活性の測定

脂肪酸の取り込みの活性を見るために、 $[^{14}\text{C}]$ ラベルしたオレイン酸の組換え細胞内への取り込みについて検討した。上記のように15 cm径シャーレ中で293細

胞にリン酸カルシウム法、またはリポフェクトアミンを用いてプラスミドを導入し、翌日に培地を交換した。アッセイの前日に培地を10% 脂肪酸無添加 CSを含むD-MEM(antibiotics -)に交換して1日培養した。アッセイ当日にまずアルブミン結合脂肪酸(Albumin-bounded fatty acid)を作製した。40℃に保温したミリQ水 100 μ lに [14 C]-オレイン酸 10 μ lを加え軽く攪拌した後、脂肪酸無添加BSA溶液(fr.V, SIGMA, 20 g / 100 ml)を最終モル比が1:1になるように加え、緩やかに攪拌した。それに2倍量のPBS(-)を添加し、37℃で45分間反応させた。細胞の培養上清を吸い取り、細胞を5mlのPBS(-)で2回洗浄後、PBS(-)を5mlシャーレに加え、セルスクレイパーで細胞を掻き取りチューブに移した。遠心して細胞を集めた後、 5×10^5 cells / mlになるようにPBS(-)を添加した。その後、細胞懸濁液を200 μ lずつ氷中の15 ml容ポリプロピレンチューブに移した。細胞懸濁液を37℃で5分間プレインキュベートした後、50 μ lのアルブミン結合脂肪酸([14 C]-オレイン酸アルブミン結合溶液)を各チューブに加えて37℃で3分間反応させた。反応後予め氷冷したStop solution (=Washing solution; 0.1 % BSA(脂肪酸無添加)、200 μ M phloretin in PBS (-)) 5 mlを各チューブに加えて反応を止めた後、saturate buffer (0.1 % BSA (脂肪酸無添加) in PBS(-))中で一晩サチュレートさせたGF/C グラスフィルターで細胞を濾過後、5 mlのWashing solutionで3回細胞を洗浄した。その後、このグラスフィルターを10 mlのクリアソルIを入れた液体シンチレーション用バイアル中で一晩ソークした後、カウントを測定した。

【 0 0 3 8 】

その結果、PSEC67を一過的に導入した細胞は、Mock transfectionの細胞に比べてオレイン酸の取り込みを有意に増加させた(図2)。コントロールとしてrat FATP-1を導入した細胞もオレイン酸の取り込みを増加させた。293細胞にベクターのみを導入したもの(Mock transfection)もオレイン酸の取り込みを上昇させたが、これは宿主細胞である293が腎臓由来の細胞であり、脂肪酸輸送タンパク質(Fatty acid transport protein)をもともと若干発現しているためと考えられる。

また、G-418で高発現しているクローンを選択することによって、PSEC67を持

続的に発現する組換え細胞株を樹立し、それについてもオレイン酸の取り込みを検討したところ、Mockクローンに対して有意にその取り込みを上昇させた（図3）。

【 0 0 3 9 】

〔実施例5〕組織分布の検討

PCR法によりPSEC67のヒト正常組織における組織分布を検討した。ヒト正常組織cDNAは、Multiple Tissue cDNA Panel (CLONTECH)を用いた。La taq polymerase（宝酒造）を用いてPCR法を実施した。プライマーは以下のプライマーを用いた。

5'-oligo; 5' - AACAGGGCTGCACGCGCCTT -3' （配列番号：7）

3'-oligo; 5' - CGGGATCCACCTGCAACGGGCCCC CACCCACAGAGTTC -3' （配列番号：8）

PCRのサイクル数は25、30、35回を行い、バンドの濃度がサチュレーションを起こしていないサイクル数（30サイクル）で発現の判定を行った。

PCR法により組織分布を検討した結果、脳、骨格筋、腎臓、脾臓、胸腺、前立腺、小腸、大腸等の組織で発現していることが確認された。また肝臓、卵巣、末梢血、リンパ球でも若干の発現がみられた（図4）。これらのことから、本発明のタンパク質PSEC67は、各組織から脂肪酸を取り入れて最終的にエネルギーを各組織細胞に与える働きをすると考えられるほか、小腸、結腸からの脂肪酸の取り込みに関与するものと考えられる。また免疫系に関与する可能性も示唆される。

【 0 0 4 0 】

〔実施例6〕PSEC67の脂肪酸選択性の検討

PSEC67の長鎖脂肪酸選択性を以下のようにして検討した。つまり実施例4において、放射性同位元素標識した長鎖脂肪酸についてBSA結合脂肪酸を作製すると同時に、cold脂肪酸についてもBSA結合脂肪酸を作製した。すなわち放射性同位元素標識した長鎖脂肪酸の20倍濃度のcold長鎖脂肪酸を用意し、それに脂肪酸無添加BSAを最終モル比がオレイン酸の場合1:1、アラキドン酸の場合1:10になるように加え、穏やかに攪拌後、2倍量のPBS(-)を添加し、37℃で45分間反応させた。

準備した細胞懸濁液を37℃で5分間プレインキュベートした後、cold脂肪酸/B SA溶液を50 μ l加え、さらに3分間37℃にてインキュベートした。その後、放射性同位元素標識したアルブミン結合脂肪酸を50 μ l加えて3分間反応させた。反応後、予め氷冷したstop solution (=Washing solution; 1% BSA (脂肪酸無添加)、200 μ M phloretin in PBS(-))5mlを各チューブに加えて反応を停止した。以降の手順は、実施例4と同様に行なった。

その結果を図5に示す。PSEC67を導入した細胞は、Mock transfectionの細胞に比べてオレイン酸、アラキドン酸ともその取り込みを有意に増加させた。またそれらの取り込みは、coldのオレイン酸により有意に抑制された。しかし同様にトランスポーターを介して細胞内に輸送されるグルコースはそれらの取り込みを抑制しなかった。以上のことから、本発明のタンパク質はオレイン酸、アラキドン酸等の長鎖脂肪酸の輸送に対して選択性を示すことが分かった。また、長鎖脂肪酸間での選択性が無い、もしくはあっても弱いものと考えられた。

【0041】

【発明の効果】

本発明により長鎖脂肪酸の代謝、特に細胞への長鎖脂肪酸の取り込みに関与する新規な膜タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。本発明のタンパク質や該タンパク質をコードする遺伝子、および該取り込み活性を制御する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝異常に伴う種々の疾患（糖尿病、動脈硬化、肥満等代謝性疾患、心筋症、筋肉症、腎障害等）に対する、予防もしくは治療薬への利用が期待される。

【0042】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Fatty acid transport protein and gene coding same.

<130> H1-A0001

<140>

<141>

<150> JP 11-194179

<151> 1999-07-08

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2405

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(2248)

<400> 1

gcactcctcc cgggtttctg ctctccgcc gtgtggagtg gtgggggcct gggtggga 58

atg ggc gtg tgc cag cgc acg cgc gct ccc tgg aag gag aag tct cag 106

Met Gly Val Cys Gln Arg Thr Arg Ala Pro Trp Lys Glu Lys Ser Gln

1

5

10

15

cta gaa cga gcg gcc cta ggt ttt cgg aag gga gga tca ggg atg ttt 154
Leu Glu Arg Ala Ala Leu Gly Phe Arg Lys Gly Gly Ser Gly Met Phe

20

25

30

gcg agc ggc tgg aac cag acg gtg ccg ata gag gaa gcg ggc tcc atg 202
Ala Ser Gly Trp Asn Gln Thr Val Pro Ile Glu Glu Ala Gly Ser Met

35

40

45

gct gcc ctc ctg ctg ctg ccc ctg ctg ctg ttg cta ccg ctg ctg ctg 250
Ala Ala Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu

50

55

60

ctg aag cta cac ctc tgg ccg cag ttg cgc tgg ctt ccg gcg gac ttg 298
Leu Lys Leu His Leu Trp Pro Gln Leu Arg Trp Leu Pro Ala Asp Leu

65

70

75

80

gcc ttt gcg gtg cga gct ctg tgc tgc aaa agg gct ctt cga gct cgc 346
Ala Phe Ala Val Arg Ala Leu Cys Cys Lys Arg Ala Leu Arg Ala Arg

85

90

95

gcc ctg gcc gcg gct gcc gcc gac ccg gaa ggt ccc gag ggg ggc tgc 394
Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Glu Gly Pro Glu Gly Gly Cys

100

105

110

agc ctg gcc tgg cgc ctc gcg gaa ctg gcc cag cag cgc gcc gcg cac 442
Ser Leu Ala Trp Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gln Arg Ala Ala His

115

120

125

acc ttt ctc att cac ggc tcg cgg cgc ttt agc tac tca gag gcg gag 490

Thr Phe Leu Ile His_Gly Ser Arg Arg Phe Ser Tyr Ser Glu Ala Glu
130 135 140

cgc gag agt aac agg gct gca cgc gcc ttc cta cgt gcg cta ggc tgg 538
Arg Glu Ser Asn Arg Ala Ala Arg Ala Phe Leu Arg Ala Leu Gly Trp
145 150 155 160

gac tgg gga ccc gac ggc ggc gac agc ggc gag ggg agc gct gga gaa 586
Asp Trp Gly Pro Asp Gly Gly Asp Ser Gly Glu Gly Ser Ala Gly Glu
165 170 175

ggc gag cgg gca gcg ccg gga gcc gga gat gca gcg gcc gga agc ggc 634
Gly Glu Arg Ala Ala Pro Gly Ala Gly Asp Ala Ala Ala Gly Ser Gly
180 185 190

gcg gag ttt gcc gga ggg gac ggt gcc gcc aga ggt gga gga gcc gcc 682
Ala Glu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Ala Ala Arg Gly Gly Gly Ala Ala
195 200 205

gcc cct ctg tca cct gga gca act gtg gcg ctg ctc ctc ccc gct ggc 730
Ala Pro Leu Ser Pro Gly Ala Thr Val Ala Leu Leu Leu Pro Ala Gly
210 215 220

cca gag ttt ctg tgg ctc tgg ttc ggg ctg gcc aag gcc ggc ctg cgc 778
Pro Glu Phe Leu Trp Leu Trp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Gly Leu Arg
225 230 235 240

act gcc ttt gtg ccc acc gcc ctg cgc cgg ggc ccc ctg ctg cac tgc 826
Thr Ala Phe Val Pro Thr Ala Leu Arg Arg Gly Pro Leu Leu His Cys

245	250	255	
ctc cgc agc tgc ggc gcg cgc gcg ctg gtg ctg gcg cca gag ttt ctg			874
Leu Arg Ser Cys Gly Ala Arg Ala Leu Val Leu Ala Pro Glu Phe Leu			
260	265	270	
gag tcc ctg gag ccg gac ctg ccc gcc ctg aga gcc atg ggg ctc cac			922
Glu Ser Leu Glu Pro Asp Leu Pro Ala Leu Arg Ala Met Gly Leu His			
275	280	285	
ctg tgg gct gca ggc cca gga acc cac cct gct gga att agc gat ttg			970
Leu Trp Ala Ala Gly Pro Gly Thr His Pro Ala Gly Ile Ser Asp Leu			
290	295	300	
ctg gct gaa gtg tcc gct gaa gtg gat ggg cca gtg cca gga tac ctc			1018
Leu Ala Glu Val Ser Ala Glu Val Asp Gly Pro Val Pro Gly Tyr Leu			
305	310	315	320
tct tcc ccc cag agc ata aca gac acg tgc ctg tac atc ttc acc tct			1066
Ser Ser Pro Gln Ser Ile Thr Asp Thr Cys Leu Tyr Ile Phe Thr Ser			
325	330	335	
ggc acc acg ggc ctc ccc aag gct gct cgg atc agt cat ctg aag atc			1114
Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Ala Ala Arg Ile Ser His Leu Lys Ile			
340	345	350	
ctg caa tgc cag ggc ttc tat cag ctg tgt ggt gtc cac cag gaa gat			1162
Leu Gln Cys Gln Gly Phe Tyr Gln Leu Cys Gly Val His Gln Glu Asp			
355	360	365	

gtg atc tac ctc gcc ctc cca ctc tac cac atg tcc ggt tcc ctg ctg	1210
Val Ile Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Tyr His Met Ser Gly Ser Leu Leu	
370 375 380	
ggc atc gtg ggc tgc atg ggc att ggg gcc aca gtg gtg ctg aaa tcc	1258
Gly Ile Val Gly Cys Met Gly Ile Gly Ala Thr Val Val Leu Lys Ser	
385 390 395 400	
aag ttc tcg gct ggt cag ttc tgg gaa gat tgc cag cag cac agg gtg	1306
Lys Phe Ser Ala Gly Gln Phe Trp Glu Asp Cys Gln Gln His Arg Val	
405 410 415	
acg gtg ttc cag tac att ggg gag ctg tgc cga tac ctt gtc aac cag	1354
Thr Val Phe Gln Tyr Ile Gly Glu Leu Cys Arg Tyr Leu Val Asn Gln	
420 425 430	
ccc ccg agc aag gca gaa cgt ggc cat aag gtc cgg ctg gca gtg ggc	1402
Pro Pro Ser Lys Ala Glu Arg Gly His Lys Val Arg Leu Ala Val Gly	
435 440 445	
agc ggg ctg cgc cca gat acc tgg gag cgt ttt gtg cgg cgc ttc ggg	1450
Ser Gly Leu Arg Pro Asp Thr Trp Glu Arg Phe Val Arg Arg Phe Gly	
450 455 460	
ccc ctg cag gtg ctg gag aca tat gga ctg aca gag ggc aac gtg gcc	1498
Pro Leu Gln Val Leu Glu Thr Tyr Gly Leu Thr Glu Gly Asn Val Ala	
465 470 475 480	

acc atc aac tac aca gga cag cgg ggc gct gtg ggg cgt gct tcc tgg 1546

Thr Ile Asn Tyr Thr Gly Gln Arg Gly Ala Val Gly Arg Ala Ser Trp

485

490

495

ctt tac aag cat atc ttc ccc ttc tcc ttg att cgc tat gat gtc acc 1594

Leu Tyr Lys His Ile Phe Pro Phe Ser Leu Ile Arg Tyr Asp Val Thr

500

505

510

aca gga gag cca att cgg gac ccc cag ggg cac tgt atg gcc aca tct 1642

Thr Gly Glu Pro Ile Arg Asp Pro Gln Gly His Cys Met Ala Thr Ser

515

520

525

cca ggt gag cca ggg ctg ctg gtg gcc ccg gta agc cag cag tcc cca 1690

Pro Gly Glu Pro Gly Leu Leu Val Ala Pro Val Ser Gln Gln Ser Pro

530

535

540

ttc ctg ggc tat gct ggc ggg cca gag ctg gcc cag ggg aag ttg cta 1738

Phe Leu Gly Tyr Ala Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln Gly Lys Leu Leu

545

550

555

560

aag gat gtc ttc cgg cct ggg gat gtt ttc ttc aac act ggg gac ctg 1786

Lys Asp Val Phe Arg Pro Gly Asp Val Phe Phe Asn Thr Gly Asp Leu

565

570

575

ctg gtc tgc gat gac caa ggt ttt ctc cgc ttc cat gat cgt act gga 1834

Leu Val Cys Asp Asp Gln Gly Phe Leu Arg Phe His Asp Arg Thr Gly

580

585

590

gac acc ttc agg tgg aag ggg gag aat gtg gcc aca acc gag gtg gca 1882

Asp Thr Phe Arg Trp Lys Gly Glu Asn Val Ala Thr Thr Glu Val Ala

595

600

605

gag gtc ttc gag gcc cta gat ttt ctt cag gag gtg aac gtc tat gga 1930

Glu Val Phe Glu Ala Leu Asp Phe Leu Gln Glu Val Asn Val Tyr Gly

610

615

620

gtc act gtg cca ggg cat gaa ggc agg gct gga atg gca gcc cta gtt 1978

Val Thr Val Pro Gly His Glu Gly Arg Ala Gly Met Ala Ala Leu Val

625

630

635

640

ctg cgt ccc ccc cac gct ttg gac ctt atg cag ctc tac acc cac gtg 2026

Leu Arg Pro Pro His Ala Leu Asp Leu Met Gln Leu Tyr Thr His Val

645

650

655

tct gag aac ttg cca cct tat gcc cgg ccc cga ttc ctc agg ctc cag 2074

Ser Glu Asn Leu Pro Pro Tyr Ala Arg Pro Arg Phe Leu Arg Leu Gln

660

665

670

gag tct ttg gcc acc aca gag acc ttc aaa cag cag aaa gtt cgg atg 2122

Glu Ser Leu Ala Thr Thr Glu Thr Phe Lys Gln Gln Lys Val Arg Met

675

680

685

gca aat gag ggc ttc gac ccc agc acc ctg tct gac cca ctg tac gtt 2170

Ala Asn Glu Gly Phe Asp Pro Ser Thr Leu Ser Asp Pro Leu Tyr Val

690

695

700

ctg gac cag gct gta ggt gcc tac ctg ccc ctc aca act gcc cgg tac 2218

Leu Asp Gln Ala Val Gly Ala Tyr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Arg Tyr

705

710

715

720

agc gcc ctc ctg gca gga aac ctt cga atc tgagaacttc cacacctgag 2268

Ser Ala Leu Leu Ala Gly Asn Leu Arg Ile

725

730

gcacctgaga gaggaactct gtgggggtggg ggccgttgca ggtgtactgg gctgtcaggg 2328

atcttttcta taccagaact gcggtcacta ttttgtaata aatgtggctg gagctgatcc 2388

agctgtctct gacctac 2405

<210> 2

<211> 730

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Val Cys Gln Arg Thr Arg Ala Pro Trp Lys Glu Lys Ser Gln

1

5

10

15

Leu Glu Arg Ala Ala Leu Gly Phe Arg Lys Gly Gly Ser Gly Met Phe

20

25

30

Ala Ser Gly Trp Asn Gln Thr Val Pro Ile Glu Glu Ala Gly Ser Met

35

40

45

Ala Ala Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu

50

55

60

Leu Lys Leu His Leu Trp Pro Gln Leu Arg Trp Leu Pro Ala Asp Leu

65

70

75

80

Ala Phe Ala Val Arg Ala Leu Cys Cys Lys Arg Ala Leu Arg Ala Arg

85

90

95

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Asp Pro Glu Gly Pro Glu Gly Gly Cys

100

105

110

Ser Leu Ala Trp Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gln Arg Ala Ala His

115

120

125

Thr Phe Leu Ile His Gly Ser Arg Arg Phe Ser Tyr Ser Glu Ala Glu

130

135

140

Arg Glu Ser Asn Arg Ala Ala Arg Ala Phe Leu Arg Ala Leu Gly Trp

145

150

155

160

Asp Trp Gly Pro Asp Gly Gly Asp Ser Gly Glu Gly Ser Ala Gly Glu

165

170

175

Gly Glu Arg Ala Ala Pro Gly Ala Gly Asp Ala Ala Ala Gly Ser Gly

180

185

190

Ala Glu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Ala Ala Arg Gly Gly Gly Ala Ala

195

200

205

Ala Pro Leu Ser Pro Gly Ala Thr Val Ala Leu Leu Leu Pro Ala Gly
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Trp Leu Trp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Gly Leu Arg
225 230 235 240

Thr Ala Phe Val Pro Thr Ala Leu Arg Arg Gly Pro Leu Leu His Cys
245 250 255

Leu Arg Ser Cys Gly Ala Arg Ala Leu Val Leu Ala Pro Glu Phe Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Glu Pro Asp Leu Pro Ala Leu Arg Ala Met Gly Leu His
275 280 285

Leu Trp Ala Ala Gly Pro Gly Thr His Pro Ala Gly Ile Ser Asp Leu
290 295 300

Leu Ala Glu Val Ser Ala Glu Val Asp Gly Pro Val Pro Gly Tyr Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Gln Ser Ile Thr Asp Thr Cys Leu Tyr Ile Phe Thr Ser
325 330 335

Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Ala Ala Arg Ile Ser His Leu Lys Ile
340 345 350

Leu Gln Cys Gln Gly Phe Tyr Gln Leu Cys Gly Val His Gln Glu Asp
355 360 365

Val Ile Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Tyr His Met Ser Gly Ser Leu Leu

370

375

380

Gly Ile Val Gly Cys Met Gly Ile Gly Ala Thr Val Val Leu Lys Ser

385

390

395

400

Lys Phe Ser Ala Gly Gln Phe Trp Glu Asp Cys Gln Gln His Arg Val

405

410

415

Thr Val Phe Gln Tyr Ile Gly Glu Leu Cys Arg Tyr Leu Val Asn Gln

420

425

430

Pro Pro Ser Lys Ala Glu Arg Gly His Lys Val Arg Leu Ala Val Gly

435

440

445

Ser Gly Leu Arg Pro Asp Thr Trp Glu Arg Phe Val Arg Arg Phe Gly

450

455

460

Pro Leu Gln Val Leu Glu Thr Tyr Gly Leu Thr Glu Gly Asn Val Ala

465

470

475

480

Thr Ile Asn Tyr Thr Gly Gln Arg Gly Ala Val Gly Arg Ala Ser Trp

485

490

495

Leu Tyr Lys His Ile Phe Pro Phe Ser Leu Ile Arg Tyr Asp Val Thr

500

505

510

Thr Gly Glu Pro Ile Arg Asp Pro Gln Gly His Cys Met Ala Thr Ser

515	520	525
Pro Gly Glu Pro Gly Leu Leu Val Ala Pro Val Ser Gln Gln Ser Pro		
530	535	540
Phe Leu Gly Tyr Ala Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln Gly Lys Leu Leu		
545	550	555 560
Lys Asp Val Phe Arg Pro Gly Asp Val Phe Phe Asn Thr Gly Asp Leu		
565	570	575
Leu Val Cys Asp Asp Gln Gly Phe Leu Arg Phe His Asp Arg Thr Gly		
580	585	590
Asp Thr Phe Arg Trp Lys Gly Glu Asn Val Ala Thr Thr Glu Val Ala		
595	600	605
Glu Val Phe Glu Ala Leu Asp Phe Leu Gln Glu Val Asn Val Tyr Gly		
610	615	620
Val Thr Val Pro Gly His Glu Gly Arg Ala Gly Met Ala Ala Leu Val		
625	630	635 640
Leu Arg Pro Pro His Ala Leu Asp Leu Met Gln Leu Tyr Thr His Val		
645	650	655
Ser Glu Asn Leu Pro Pro Tyr Ala Arg Pro Arg Phe Leu Arg Leu Gln		
660	665	670

特2000-128993

Glu Ser Leu Ala Thr Thr Glu Thr Phe Lys Gln Gln Lys Val Arg Met
675 680 685

Ala Asn Glu Gly Phe Asp Pro Ser Thr Leu Ser Asp Pro Leu Tyr Val
690 695 700

Leu Asp Gln Ala Val Gly Ala Tyr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Arg Tyr
705 710 715 720

Ser Ala Leu Leu Ala Gly Asn Leu Arg Ile
725 730

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

ggaattcctg ccgatagagg aagcgggctc cat

33

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

cgggatccca cctgcaacgg cccccacccc acagagttc

39

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ggaattcctg ccgatagagg aagcgggctc cat

33

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

cgggatccga ttcgaaggtt tcctgccag

29

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

aacagggctg cacgcgcctt

20

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

cgggatccca cctgcaacgg cccccacccc acagagttc

39

【図面の簡単な説明】

【図1】

293細胞におけるPSEC67タンパク質の発現を示す図。

【図2】

一過的発現細胞におけるオレイン酸の取り込みを示す図。縦軸はMock transfectionの細胞の場合と比較したオレイン酸の取り込み比率を表す。

【図3】

持続的発現細胞におけるオレイン酸の取り込みを示す図。横軸の数字はクローン番号を、縦軸はMockクローンに対する脂肪酸の取り込み度（倍）を表す。

【図4】

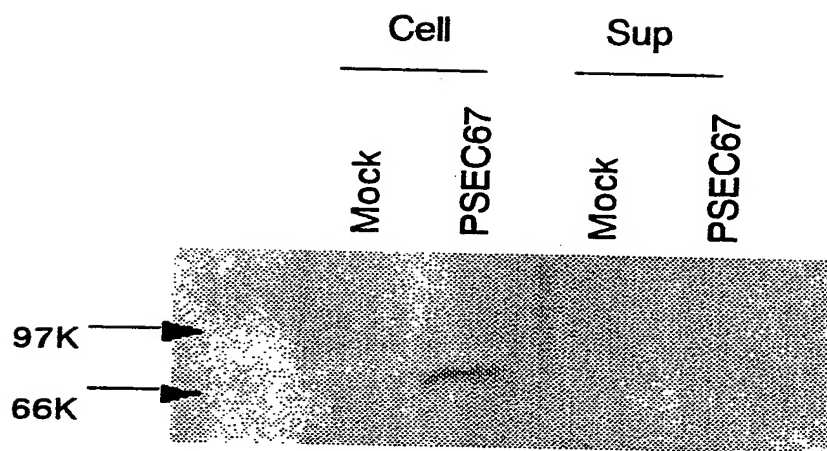
RT-PCRによるPSEC67の組織分布を示す図。

【図5】

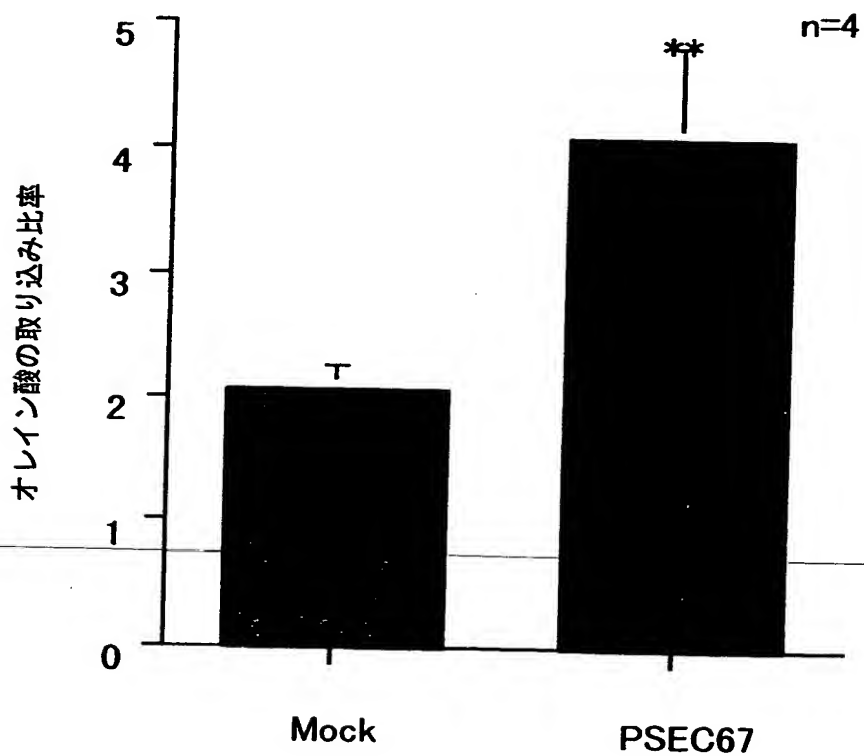
オレイン酸、またはアラキドン酸の取り込みを示す図。縦軸はMock transfectionの細胞におけるバッファーを1としたときの比率を示す。（A）は、オレイン酸、（B）はアラキドン酸の場合を表す。

【書類名】 図面

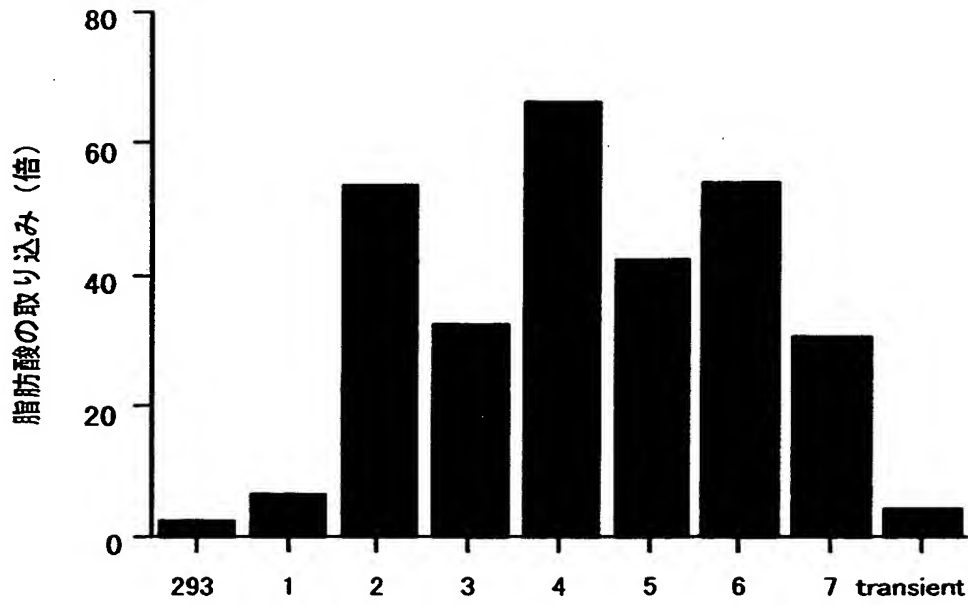
【図 1】



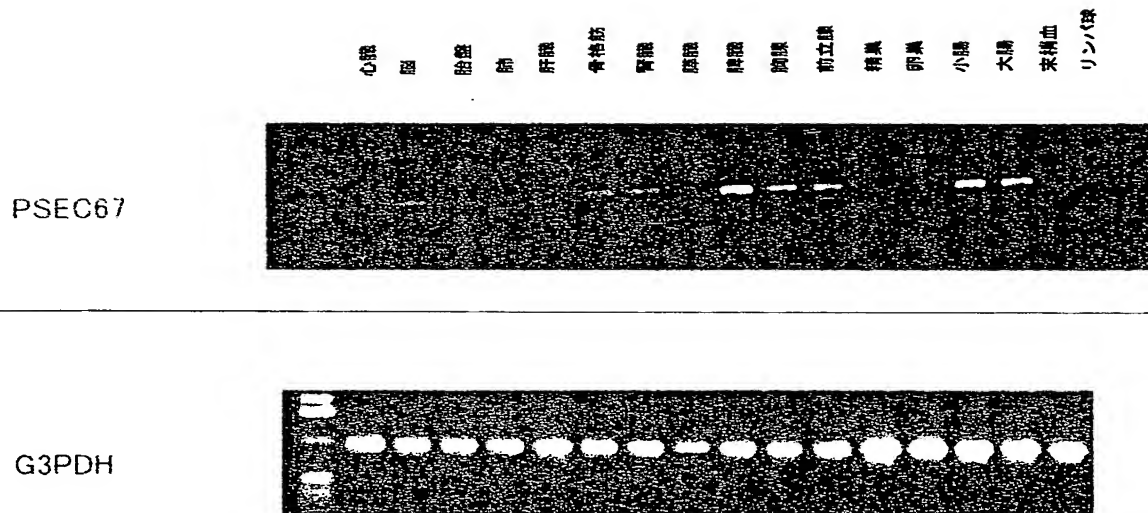
【図 2】



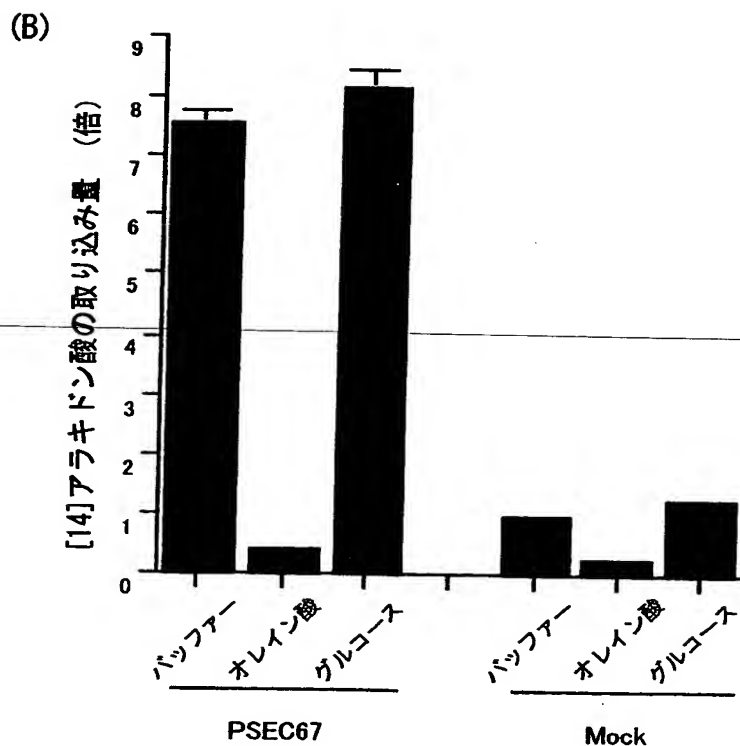
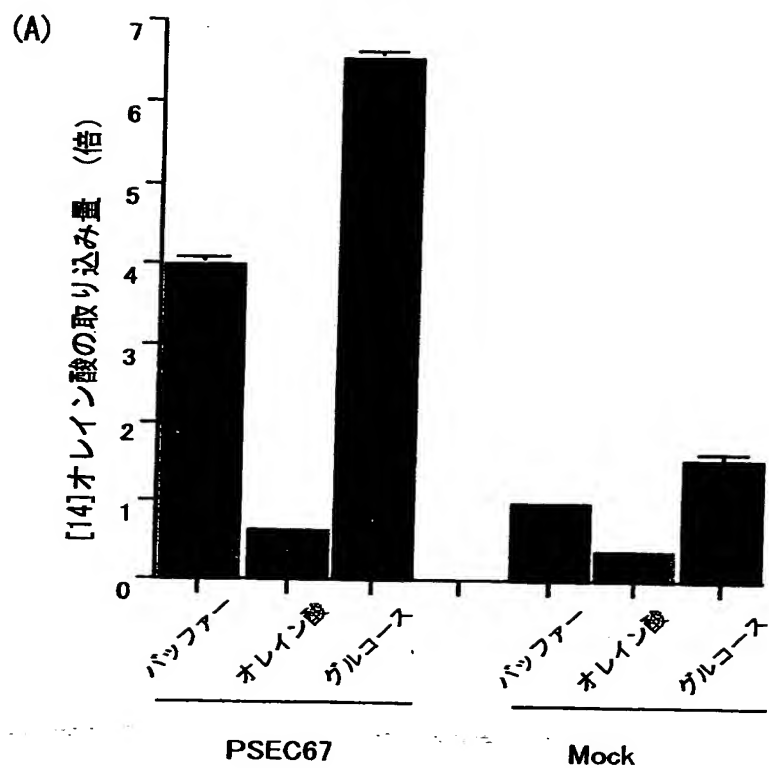
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】新規な脂肪酸輸送タンパク質(FATP)、およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。

【解決手段】全長ヒトcDNAライブラリーからクローニングされたPSEC67がコードするタンパク質が提供された。このタンパク質は、オレイン酸の取り込み活性を持つ脂肪酸輸送タンパク質(FATP)であることが確認された。本発明のタンパク質は、長鎖脂肪酸の代謝異常に伴う種々の疾患（心筋症、筋肉症、腎障害等）に対する、予防もしくは治療薬の標的分子として有用である。

【選択図】 なし

特2000-128993

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597059742]

1. 変更年月日 1997年 4月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 千葉県木更津市矢那1532番地3
氏 名 株式会社ヘリックス研究所